

Title	ジブチリルサイクリックAMP及びその類縁体の代謝と生理作用発現機構
Author(s)	中村, 裕行
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31573
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	中 村 裕 行
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 3 8 8 6 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ジブチリルサイクリックAMP及びその類縁体の代謝と生理作用発現機構
論文審査委員	(主査) 教 授 和 田 博 (副査) 教 授 吉 田 博 教 授 垣 内 史 朗

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

$N^6, 2' - 0$ -ジブチリルサイクリックAMP(DBcAMP)は膜透過性がよいという理由で, *in vivo*の実験においてサイクリックAMP(cAMP)の代用として, 広く薬理学・生理学の分野で使用されている。しかし細胞内では如何にしてcAMP作用を発現するのか未確定である。本研究はDBcAMPの細胞内代謝経路を確定しそのいずれの代謝物が如何なる機序によりcAMP作用を発現するのかを明らかにすることを目的とした。本研究にあたりダンシル(1-ジメチルアミノナフタレン-5-スルホニル)化による新しいヌクレオチドの定量法を開発しそれを用いた。

〔方法ならびに成績〕

1. ダンシル化によるヌクレオチドの定量; cAMPをはじめとして各種リボヌクレオチドはダンシル化をうけ, オレンジ色の蛍光をもつダンシルヌクレオチドを形成することを発見した。反応はpH 10.0 (重炭酸緩衝液), 60%アセトン中で行い, 過剰(30倍量)のダンシルクロリドを用いることにより100%ダンシル化することが出来る。その後, シリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開し, ダンシルヌクレオチドの蛍光を薄層スキャナーで定量した。定量範囲は200 pmoles~10n molesである。ダンシルヌクレオチドの構造決定を行ったところ, リボースはダンシル化されないにもかかわらず, ヌクレオチドにおいてはリボース部分の2'-OH基が選択的にダンシル化されていることが, 元素分析, その他の実験データにより明らかとなった。本法により一連のcAMP誘導体を測定し得た。
2. cAMPブチリル誘導体の脱ブチリル反応; 三種のcAMPブチリル誘導体[DBcAMP, N^6 -モノブチ

リルcAMP(NMBcAMP), 2'-0'-モノブチリル cAMP(OMBcAMP)]についてラット肝抽出液による分解を調べた。N⁶-ブチリル基を加水分解する酵素は存在しないが、2'-0'-ブチリル基は酵素的に加水分解され、DBcAMPはNMBcAMPに、OMBcAMPはcAMPに変換された。この酵素はラット肝の他、脳、心、腎、副腎、脾、脂肪組織にも存在し血清には存在しなかった。肝細胞については可溶性画分に存在した。

3. 2'-0'-ブチリル基加水分解酵素(2'-0'-エステラーゼ)；ラット肝抽出液より10,000 g 上清、硫酸分画(25-45%)、DEAE-セルローズ、セファデックスG-200、再びDEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより、ポリアクリルアミドゲル電気泳動でほぼ単一にまで精製した。分子量は約40万、等電点はpH 4.0、至適pHは7.0であった。この酵素は α および β -ナフチル酢酸を分解する非特異的エステラーゼの一種であるが、数多くある非特異的エステラーゼのうちの唯一種のみが2'-0'-エステラーゼ活性をもつことがわかった。また、この酵素はコリンエステラーゼ、リパーゼ活性をもたない。
4. cAMPブチリル誘導体及びP-O-モノエチルcAMP (POMEcAMP：磷酸部のモノエチルエステル)のサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ(PDE)に対する影響；PDEは分子多様性を示しDEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーによりcAMP特異的、cGMP特異的、およびその両方に作用するPDEに分画できる。cAMPブチリル誘導体はcAMP特異的PDEのみに強く阻害作用を示し、cGMP特異的PDEには殆んど阻害を示さなかった。また、POMEcAMPにもcAMP特異的PDEに対する特異的な阻害作用を認めた。

[総括]

以上の結果ならびにprotein kinase, cAMP binding proteinに対する態度、そと他の作用をまとめて表示すると下表の如くとなる。

	DBcAMP	NMBcAMP	OMBcAMP	POMEcAMP
2'-O-エステラーゼにより	NMBcAMPに変換される	分解されない	cAMPに変換される	分解されない
cAMP-binding proteinに対して	結合しない	結合する	結合しない	結合しない
protein kinaseに対して	活性化しない	活性化する。	活性化しない	活性化しない
Steroido-genesisに対して	増加させる	増加させる	増加させる	変化なし
cAMP特異的PDEに対して	阻害する	阻害する	阻害する	阻害する
PDEの基質として	cAMPの約10%の分解率	cAMPの約10%の分解率	cAMPの約50%の分解率	分解されない

これらの実験事実からDBcAMPの生理作用発現機序は細胞内でcAMPに変換されるのではなく、次の理由によると結論された。

- 1) 2'-O-エステラーゼによりNMBcAMPに変換し、そのものがprotein kinaseを活性化する。
- 2) NMBcAMPはPDEの基質とはなりにくく、そのものがcAMP特異的PDEを阻害する。

論文の審査結果の要旨

要旨、ジブチリルサイクリックAMP(DBcAMP)は、膜透過性がよいという理由で、in vivoの実験において、cAMPの代用として、広く使用されているが、その作用発現機構は未確定である。本研究は、新たに、ダンシル化によるcAMP、並びに、その誘導体の測定法を開発し、次の諸点を明らかにした。

1. cAMPをはじめ各種ヌクレオチドは、通常より高いpH(pH10.0)でダンシル化を受け、蛍光物質を形成し、蛍光定量が可能である(0.2~10n moles)。ダンシル化は、リボースの2'-OHにおこり、2'-O-モノダンシルヌクレオチドを形成する。
2. この方法を用いて、DBcAMPの肝抽出液による脱ブチリル反応を検討したところ、N⁶-ブチリル基は分解されず、2'-O-ブチリル基は酵素的に分解され、N⁶-モノブチリルcAMPとなる。

3. 上述の酵素を肝抽出液より、約1000倍精製した。分子量約30万、至適pH 7.0であり、数種ある非特異エステラーゼのうち、特定の一つのみが、本酵素活性を有する。
 4. DBcAMPはcAMPに戻らず、N⁶-モノブチリルcAMPの形でcAMP依存性プロテインキナーゼを活性化する。
 5. cAMPブチリル誘導体はcAMP特異的ホスホジエステラーゼを強く阻害するが、このために、細胞内で合成されるcAMPの分解が抑制されて、cAMPの作用が発現する可能性は否定的である。
- 本論文はDBcAMPのcAMP作用発現機構を明確にしたものであり、学位論文として価値あるものと認められる。